

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

WEST

 Generate Collection

L7: Entry 20 of 20

File: DWPI

Feb 6, 1985

DERWENT-ACC-NO: 1985-070861

DERWENT-WEEK: 198512

COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

**TITLE:** Method of determining disease-relating substance - comprises reagent of oxidase enzyme bound with flavin-adenine(di) nucleotide, tetrazolium cpd. and reduced type electron transfer cpd.

**PATENT-ASSIGNEE:**

|                     |      |
|---------------------|------|
| ASSIGNEE            | CODE |
| NIPPON CHEMIPHAR CO | NICM |

**PRIORITY-DATA:** 1983JP-0130637 (July 18, 1983)**PATENT-FAMILY:**

| PUB-NO        | PUB-DATE         | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC |
|---------------|------------------|----------|-------|----------|
| JP 60024199 A | February 6, 1985 |          | 003   |          |

**APPLICATION-DATA:**

| PUB-NO       | APPL-DATE     | APPL-NO        | DESCRIPTOR |
|--------------|---------------|----------------|------------|
| JP 60024199A | July 18, 1983 | 1983JP-0130637 |            |

**INT-CL (IPC):** C12Q 1/26; G01N 33/50**ABSTRACTED-PUB-NO:** JP 60024199A**BASIC-ABSTRACT:**

Method comprises treating a sample (e.g. blood serum) with a colouring reagent contg. oxidase system enzyme bound with flavin adenine dinucleotide (FAD) or flavin mononucleotide (FMN) as coenzyme, reduced type electron transferring matter and tetrazolium cpd. for colouring. Pref. oxidase system enzyme to be bound with FAD or FMN is e.g. xanthine oxidase, glucose oxidase, choline oxidase, uricase, etc. Reduced type electron transferring matter is e.g. 1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulphate (1-M-PMS), phenazine methosulphate (PMS), 9-dimethyl amino-benzo-alpha-phenazoxonium chloride (Meldola's Blue), etc., pref. 1-M-PMS because of excellent stability to light. Tetrazolium salt is e.g. nitrotetrazolium blue (NTB) or 3-(p-indolphenyl)-2-(p-nitrophenyl)-5-phe- nyl -2H-tetrazolium chloride. The amt. of oxidase system enzyme, reduced type electron transferring matter and tetrazolium salt combined is 0.05-0.2 wt.%, 0.002-0.005 wt.% and 0.01-0.04 wt.% based on the total amt. of the colouring reagent. For colouring by treating a sample with the colouring reagent, the reaction liq. is incubated for 10-40 min. at 25-45 deg. C by using e.g. 0.5 M phosphoric acid buffer liq. (pH 7.5).

**USE/ADVANTAGE** - Oxidase using flavin as coenzyme reduces tetrazolium salt via electron transferring matter (hydrogen transferring matter) in the presence of a substrate to form formazan. The object substance (e.g. xanthine, hypoxanthine, glucose, uric acid, phospholipid, etc.) can be easily and accurately determined by colourimetry by preparing standard liqs. of a substance to be determined. The method is not affected negatively by ascorbic acid, so the determin. can be carried out with very high accuracy when compared with previous oxidase methods, which is useful for clinical tests.

**CHOSEN-DRAWING:** Dwg.0/0

**TITLE-TERMS:** METHOD DETERMINE DISEASE RELATED SUBSTANCE COMPRISE REAGENT OXIDASE ENZYME BOUND FLAVIN ADENINE DI NUCLEOTIDE TETRAZOLIUM COMPOUND REDUCE TYPE ELECTRON TRANSFER COMPOUND

**DERWENT-CLASS:** B04 D16

CPI-CODES: B04-B01B; B04-B02C2; B04-B03; B04-B04D; B06-D09; B06-D16; B06-E05; B07-D13; B10-A07; B11-C07B;  
B12-K04; D05-A02;

**CHEMICAL-CODES:**

Chemical Indexing M1 \*05\*

Fragmentation Code  
M423 M750 M903 N102 N134 Q233 V771

Chemical Indexing M1 \*06\*

Fragmentation Code  
M423 M430 M782 M903 N102 N134 P831 Q233 V802 V811

Chemical Indexing M1 \*15\*

Fragmentation Code  
M423 M760 M903 N102 N134 Q233 V600 V614

Chemical Indexing M2 \*01\*

Fragmentation Code  
D013 D932 J5 J522 K0 L9 L910 M280 M320 M412  
M511 M520 M530 M540 M750 M903 M910 N102 N134 Q233  
V0 V460

Chemical Indexing M2 \*02\*

Fragmentation Code  
D011 D931 J5 J521 K0 L9 L941 M280 M320 M412  
M511 M520 M530 M540 M750 M903 M910 N102 N134 Q233

Chemical Indexing M2 \*03\*

Fragmentation Code  
H4 H405 H484 H8 J4 J471 K0 L8 L814 L821  
L831 M280 M315 M321 M332 M344 M349 M381 M391 M416  
M620 M750 M903 M910 N102 N134 Q233

Chemical Indexing M2 \*04\*

Fragmentation Code  
D012 D013 D932 J5 J523 K0 L9 L910 L921 M280  
M320 M412 M511 M520 M530 M540 M750 M903 M910 N102  
N134 Q233

Chemical Indexing M2 \*07\*

Fragmentation Code  
B615 B702 B713 B720 B797 B815 B832 D011 D013 D019  
D023 D931 E270 F012 F013 F014 F015 F113 H1 H100  
H122 H181 H2 H202 H4 H405 H422 H483 H8 J5  
J522 K0 L8 L812 L819 L821 L833 L834 L9 L910  
L943 M210 M211 M240 M282 M311 M315 M321 M332 M342  
M344 M373 M383 M391 M411 M430 M512 M521 M530 M540  
M782 M903 M910 N102 P831 Q233 V0 V322 V762 V801

Chemical Indexing M2 \*08\*

Fragmentation Code  
B615 B701 B713 B720 B815 B831 D011 D013 D023 E270  
H1 H181 H2 H201 H4 H403 H483 H8 J5 J522  
K0 L8 L812 L821 L833 L834 L9 L910 M210 M211  
M240 M282 M315 M321 M332 M344 M383 M391 M411 M430  
M511 M520 M530 M540 M782 M903 M910 N102 P831 Q233  
V0 V322 V762 V801

Chemical Indexing M2 \*09\*

Fragmentation Code  
D011 D021 E210 H541 K0 L7 L721 M210 M211 M272  
M273 M281 M320 M412 M430 M511 M520 M530 M540 M650  
M782 M903 N102 P831 Q233

## Chemical Indexing M2 \*10\*

Fragmentation Code

K0 K4 K421 M210 M211 M272 M320 M416 M430 M620  
M630 M782 M903 N102 P831 Q233

## Chemical Indexing M2 \*11\*

Fragmentation Code

C108 D022 E540 H1 H103 H141 K0 L7 L730 M210  
M211 M273 M282 M320 M412 M430 M511 M520 M530 M540  
M770 M782 M903 N102 P831 Q233

## Chemical Indexing M2 \*12\*

Fragmentation Code

A430 A940 C017 C100 C730 C801 C803 C804 C805 C806  
C807 M411 M430 M770 M782 M903 M910 N102 P831 Q233

## Chemical Indexing M2 \*13\*

Fragmentation Code

F012 F013 F015 F019 F570 F599 G010 G013 G015 G019  
G100 H2 H212 H3 H342 H5 H542 H8 K0 L7  
L723 M1 M111 M113 M119 M210 M211 M272 M282 M320  
M413 M430 M510 M522 M533 M540 M782 M903 N102 P831  
Q233 Q312 Q505

## Chemical Indexing M2 \*14\*

Fragmentation Code

F012 F013 F015 F570 G010 G013 G019 G100 H2 H211  
H3 H341 K0 L3 L355 L7 L721 L9 L952 M1  
M113 M121 M143 M280 M320 M413 M430 M510 M521 M533  
M540 M782 M903 N102 P831 Q233 Q312 Q505

## Chemical Indexing M6 \*16\*

Fragmentation Code

M903 P831 Q233 Q312 Q505 R305 R309 R514 R611 R623  
R624 R627 R633 R634 R639

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0038U; 0285U ; 0293U ; 0295U ; 1156U ; 1157U ;  
1703U

UNLINKED-RING-INDEX-NUMBERS: 00061; 04922

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1985-030752

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1985-052918

## ⑱ 公開特許公報 (A)

昭60-24199

⑲ Int. Cl.  
C 12 Q 1/26  
G 01 N 33/50  
33/66  
33/92

識別記号

序内整理番号  
8213-4B  
A 8305-2G  
8305-2G  
8305-2G

⑳ 公開 昭和60年(1985)2月6日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

## ㉑ 疾病関連物質の定量法

㉒ 特 願 昭58-130637

㉓ 出 願 昭58(1983)7月18日

㉔ 発 明 者 篠原力雄

各務原市鵜沼台3-22

㉕ 発 明 者 石黒伊三雄

春日井市朝宮町7149

㉖ 出 願 人 日本ケミファ株式会社

東京都千代田区岩本町2丁目2  
番3号

㉗ 代 理 人 弁理士 有賀三幸 外2名

## 明細書

## 1. 発明の名称

疾病関連物質の定量法

## 2. 特許請求の範囲

補酵素としてFAD又はFMNを結合するオキシダーゼ系酵素、還元型電子伝達体及びテトラゾリウム塩を含有する発色試薬を検体に作用させて発色せしめることを特徴とする疾病関連物質の定量法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、キサンチン、ヒポキサンチン、グルコース、尿酸、リン脂質等の疾病関連物質の定量法に関する。

一般に、反応生成物として過酸化水素を生じるオキシダーゼは、色原体とペルオキシダーゼと共にグルコース、コレステロール、コリン等の比色定量に利用せられている。

然しながら、斯かる所謂従来オキシダーゼ法は、血清中の共存成分であるアスコルビン酸の影響による測定値の低下を免れないと云う難点がある。

つた。

そこで、本発明者は斯かる従来の難点を解消し、信頼性の高い、臨床上有効な測定法を開発すべく種々研究を重ねた結果、フラビンを補酵素とするオキシダーゼが、その基質存在下で電子伝達体(水素伝達体)を介してテトラゾリウム塩を還元してホルマザンを生成することを見い出し、本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は補酵素としてFAD又はFMNを結合するオキシダーゼ系酵素、還元型電子伝達体及びテトラゾリウム塩を含有する発色試薬を検体に作用させて発色せしめることを特徴とする疾病関連物質の定量法である。

本発明に於て補酵素としてFADすなわちフラビンアデニンジヌクレオチド又はFMNすなわちフラビンモノヌクレオチドを結合するオキシダーゼ系酵素としては、例えばキサンチンオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ウリカーゼ等が挙げられ、定量物質に対応して適宜選択使用される。

また、還元型電子伝導体としては、例えば1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート(1-M-PMS)、フェナジンメタルサルフェート(PMS)、9-ジメチルアミノベンゾ- $\alpha$ -フェナゾキソニウムクロライド(メルドブルー)等が挙げられ、就中1-M-PMSが光に対する安定性に優れ特に有利である。

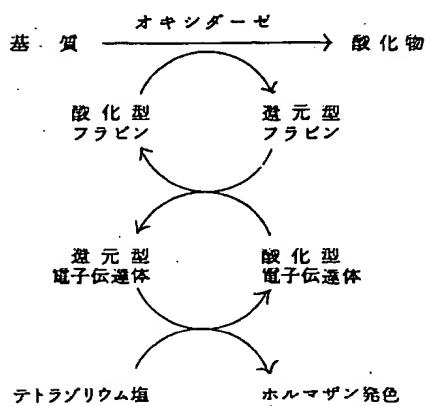
また、テトラゾリウム塩としては、ニトロテトラゾリウムブルー(NTB)、3-(パラインドフェニル)-2-(パラニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウムクロライド(INT)が挙げられる。

本発明に於ては上記三物質が発色試薬の必須成分とされるが、更に必要に応じてトリトン-X 100の如き酵素試験活剤が配合使用される。

尚、上記三物質すなわちオキシダーゼ系酵素、還元型電子伝導体及びテトラゾリウム塩の配合量は、試薬全量に対してそれぞれ0.05~0.2重量%、0.002~0.005重量%、0.01~0.04重量%が好ましい。

而して、本発明は斯かる試薬を検体に作用させて発色せしめるものであるが、該作用法としては、例えば0.5Mリン酸緩衝液(pH7.5)等を用いて25~45°Cで10~40分間程度インキュベーションする方法が挙げられる。

因に、当該インキュベーションにより発色が生じるが、これは次式の如き発色原理によるものと思料される。



すなわち、本発明の発色原理は必ずしも判然としないが、電子伝導体が存在しないときは、オキシダーゼが基質から脱水素した水素を酸素( $O_2$ )へ渡すので過酸化水素を生じるが、電子伝導体が存在するとオキシダーゼの補酵素(フラビン)に結合している水素が酸素( $O_2$ )とよりも酸化還元電位の低い電子伝導体との反応が容易なため、ホルマザンを生成するものと考えられる。

本発明は以上の如き方法により発色せしめるものであるため、予め定量せんとする物質につき各段階量の標準液を作製して置くことにより、検体中の目的物質を極めて容易かつ確実に比色定量することができるものである。しかも本発明によれば、アスコルビン酸による負の影響を受けないので、従来のオキシダーゼ法に比し極めて高い精度の定量を行うことができるものであり、臨床上極めて有利な測定法である。

以下実施例を挙げて本発明を更に説明する。

#### 実施例1 (ヒポキサンチンの測定)

#### (1) 試薬組成

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| キサンチンオキシダーゼ(0.5mg/ml) | 0.1 ml  |
| 1-M-PMS(80mg/ml)      | 0.05 ml |
| NTB(2.5mg/ml)         | 0.2 ml  |
| 1%トリトンX-100           | 0.1 ml  |

#### (2) 緩衝液

|                   |         |
|-------------------|---------|
| 0.5Mリン酸緩衝液(pH7.5) | 0.55 ml |
|-------------------|---------|

#### (3) 標準品の測定

各濃度のヒポキサンチン0.02mlを上記試薬-緩衝液1mlに加え、37°Cにて10分間インキュベーションして発色せしめ、570nmにて吸光度を測定し、各標準吸光度を得る。因に、1.0mg/mlの吸光度は0.310であった。

#### (4) 試料の測定

血清0.02mlを試料とし、(3)と同様にして発色せしめ、570nmにて吸光度を測定したところ、0.105であった。標準吸光度より試料中のヒポキサンチン含有量を求めたところ、3.38mg/mlなる結果が得られた。

$$\frac{0.105}{0.310} \times 1.0 \text{mg/ml}$$

## 実施例2(グルコースの測定)

## (1) 試薬組成

|                      |        |
|----------------------|--------|
| グルコースオキシダーゼ(10mg/ml) | 0.05ml |
| 1-M-PMS(80mg/ml)     | 0.05ml |
| NTB(2.5mg/ml)        | 0.2ml  |

## (2) 緩衝液

|                    |       |
|--------------------|-------|
| 0.5Mリン酸緩衝液(pH 7.5) | 1.7ml |
|--------------------|-------|

## (3) 標準品の測定

各濃度のグルコース 0.05ml を上記試薬・緩衝液 2ml に加え、37℃にて 1.5 分間インキュベーションして発色せしめ、570nm にて吸光度を測定し、各標準吸光度を得る。因に、250mg/ml の吸光度は 0.80 であった。

## (4) 試料の測定

血清 0.05ml を試料とし、(3)と同様にして発色せしめ、570nm にて吸光度を測定したところ、0.425 であった。標準吸光度より試料中のグルコース含有量を求めたところ、132.8 mg/ml なる結果が得られた。 $(\frac{0.425}{0.800} \times 250\text{mg/ml})$

## 実施例3(リン脂質の測定)

なる結果が得られた。 $(\frac{0.730}{0.850} \times 200\text{mg/ml})$

## 実施例4(尿酸の測定)

## (1) 試薬組成

|                  |        |
|------------------|--------|
| ウリカーゼ(1.0mg/ml)  | 0.2ml  |
| 1-M-PMS(80mg/ml) | 0.05ml |
| INT(2.5mg/ml)    | 0.2ml  |
| 1%トリトンX-100      | 0.1ml  |

## (2) 緩衝液

|                    |       |
|--------------------|-------|
| 0.5Mリン酸緩衝液(pH 7.5) | 0.5ml |
|--------------------|-------|

## (3) 標準品の測定

各濃度の尿酸 0.1ml を上記試薬・緩衝液 1ml に加え、37℃にて 1.5 分間インキュベーションして発色せしめ、500nm にて吸光度を測定し、各標準吸光度を得る。因に、6mg/ml の吸光度は 0.220 であった。

## (4) 試料の測定

血清 0.1ml を試料とし、(3)と同様にして発色せしめ、500nm にて吸光度を測定したところ、0.280 であった。標準吸光度より試料中の尿酸含有量を求めたところ、7.6mg/ml な

## (1) 試薬組成

|                    |       |
|--------------------|-------|
| コリンオキシダーゼ(50u/ml)  | 0.2ml |
| フォスフォリバーゼD(25u/ml) | 0.2ml |
| 1-M-PMS(0.2mg/ml)  | 0.2ml |
| NTB(2.5mg/ml)      | 0.2ml |

## (2) 緩衝液

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| 0.2MトリシンNa緩衝液(pH 7.5) | 1.0ml |
|-----------------------|-------|

## (3) 標準品の測定

各濃度のリン脂質(フォスファチジルコリン)乳化液 0.02ml を上記試薬・緩衝液 2ml に加え、37℃にて 20 分間インキュベーションして発色せしめ、570nm にて吸光度を測定し、各標準吸光度を得る。因に 200mg/ml の吸光度は 0.850 であった。

## (4) 試料の測定

血清 0.02ml を試料とし、(3)と同様にして発色せしめ、570nm にて吸光度を測定したところ、0.730 であった。標準吸光度より試料中のリン脂質の含有量求めたところ、172mg/ml

なる結果が得られた。 $(\frac{0.730}{0.850} \times 200\text{mg/ml})$

以上

出願人 日本ケミファ株式会社



代理人 弁理士 有賀 三幸



弁理士 高野 登志雄



弁理士 小野 信夫

